



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Expresión de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de
alpacos (Vicugna pacos) en presencia de antígenos
clostridiales in vitro**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Raquel Andrea WATANABE WATANABE

ASESOR

Dr. Alberto MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2013

RESUMEN

Las interleucinas 2 (IL-2) y 10 (IL-10) son importantes citoquinas de la inmunidad adquirida correspondientes a los perfiles de citoquinas de las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2, respectivamente. En los últimos años se han venido realizando estudios a nivel molecular en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y con enteropatía con la finalidad de evaluar la expresión del ARNm de citoquinas de la inmunidad innata y adquirida, determinándose los patrones de la cinética de sus expresiones. No obstante, se desconoce la interacción directa de *Clostridium perfringens* con los leucocitos circulantes de alpacas (*Vicugna pacos*) en infecciones sistémicas. El objetivo del presente estudio fue determinar, mediante la técnica de RT-PCR tiempo real y cuantificación relativa según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, los niveles relativos de expresión de ARNm de IL-2 e IL-10 en leucocitos circulantes de alpacas en presencia de antígenos clostridiales in vitro, empleándose como control endógeno a GAPDH. Se colectó sangre entera usando la técnica de venopunción de la vena yugular de 5 alpacas hembras y 5 alpacas machos adultos. Las muestras fueron centrifugadas para obtener la fracción leucocitaria en gradiente de Ficoll, colectándose la capa flogística. Se realizó un pool de leucocitos que fueron purificados con cloruro de amonio y luego centrifugados, cuya concentración de células vivas se ajustó a 500 000 células/ml de medio mínimo esencial. Seguidamente, fueron cultivados en placas para cultivo celular de 24 pocillos y enfrentados a suspensiones de *Clostridium perfringens* a las concentraciones de 400ug/ml, 16ug/ml, 0.8ug/ml y 0.2ug/ml por 1, 12 y 24 horas. Posteriormente, se realizó la RT-qPCR. La cinética de la expresión de IL-2 mostró una tendencia inversamente proporcional a la dosis de antígeno clostridial en los tres tiempos de incubación ($p>0.05$), a diferencia de IL-10 cuya expresión fue variable, alcanzando el máximo a las 12 horas de incubación ($p<0.05$) mostrando un patrón similar al de IL-2. La expresión de IL-10 superó hasta en 40 veces lo expresado por el calibrador respecto a IL-2, evidenciándose una marcada respuesta hacia la polarización del subtipo Th2.

Palabras clave: interleucina 2, interleucina 10, *Clostridium perfringens*, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa

ABSTRACT

Interleukin 2 (IL-2) and 10 (IL-10) cytokines are important for acquired immunity belonging to Th1 and Th2 lymphocytes subpopulations, respectively. In recent years, several molecular studies have been developed in intestinal mucosa of young healthy and sick alpacas with enteropathy in order to assess the cytokine mRNA expressions of innate and acquired immunity and, accordingly, determining its kinetic expressions patterns. Nevertheless, the direct interaction among *Clostridium perfringens* and leukocytes is still remaining unknown in systemic diseases. The aim of this study was to determine the relative ARNm expression levels of IL-2 and IL-10 in peripheral blood leukocytes by real time RT-PCR and relative quantification based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method in presence of clostridial antigens in vitro using GAPDH as an endogenous control. Whole blood was collected using the venipuncture technique in the jugular vein from 10 animals: 5 female and 5 male adult alpacas. Samples were centrifuged to obtain leukocytes using the Ficoll reagent which were purified with ammonium chloride and cultured at a concentration of 500 000 cells/ml minimal essential medium with *Clostridium perfringens* suspensions at concentrations of 400µg/ml, 16µg/ml, 0.8µg/ml and 0.2µg/ml in culture plates of 24 wells. Subsequently, the RT-qPCR test was performed. IL-2 kinetic expression patterns were showed inversely proportional to the clostridial antigen dose in the three incubation times ($p>0.05$), unlike IL-10 which its kinetic expression patterns were variable, reaching its maximum at 12 hours ($p<0.05$) while showing a similar tendency like IL-2. IL-10 expression exceeded forty-fold the control expression respect to IL-2. A strong polarization towards the Th2 subtype was shown.

Key words: interleukin-2, interleukin-10, *Clostridium perfringens*, real time RT-PCR, relative quantification